

MICROBIOLOGIA ORAL

PASOS PRACTICOS

CUARTO SEMESTRE

PRIMAVERA 2011

Prof. Responsable del Curso: Prof. Nora Silva Steffens

Coordinador del Curso: Prof Loreto Abusleme R.

Coordinador de Pasos Prácticos: Prof. Leyla Gómez C.

Trabajo Práctico N°2

Caries Dentaria

I. Introducción

La Caries dentaria es una enfermedad infecciosa, multifactorial y transmisible que afecta a los tejidos duros del diente, específicamente el esmalte, la dentina y el cemento dentarios. Esta enfermedad comienza con una descalcificación del esmalte e invasión bacteriana de estos tejidos, una posterior destrucción de los tejidos calcificados, con pérdida de tejido o cavitación que no es recuperable. Al profundizarse el proceso de Caries, se comprometen los tejidos que aportan nutrición, defensa y sensibilidad a las piezas dentarias como el órgano pulpar, el que reacciona ante la agresión bacteriana inflamándose, esto provoca un intenso dolor en el diente afectado y si la infección del tejido pulpar continúa esta se necrosa, es decir, se muere, lo que trae aparejadas un sinnúmero de patologías derivadas del proceso de Caries.

Se ha reportado que esta enfermedad se asocia con cuatro especies bacterianas patógenas, las cuales en grado de asociación serían: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, especies del género *Lactobacilli* y *Actynomices viscosus*. Las dos primeras son las más importantes, no solo porque se encuentran presentes en todos los tipos de Caries como ser, las Caries de superficies lisas, las caries de puntos y fisuras del esmalte y las Caries de la raíz y del cuello del diente, sino también por sus características patogénicas, muy agresivos para los tejidos del diente: tienen un gran poder de adherencia a los tejidos dentario y una gran capacidad fermentativa de los hidratos de carbono, principalmente sacarosa, debido a lo cual, generan ácidos, que descalcifican las piezas dentarias. Por otra parte, estos microorganismos pueden vivir y multiplicarse en el ambiente ácido creado por ellos mismos (acidúricos).

Streptococcus mutans es la especie principal asociada con la caries dental, dada su mayor prevalencia en sitios activos, sus mecanismos de virulencia y su asociación con el inicio del proceso carioso. *Streptococcus mutans* es una especie de bacterias cocáceas, Gram positivo, agrupadas en cadenas, que crece en medios de cultivo con alta concentración de sacarosa. Uno de estos medios denominado TYCSB (Trypticase, yeast o extracto de levadura, casitona, sacarosa, y bacitracina) contiene sacarosa al 5% y bacitracina, constituyentes que le dan el carácter selectivo al medio: la sacarosa es el hidrato de carbono que aporta nutrición al microorganismo. Además es el sustrato de la enzima Glucosil transferasa (GTF) que cataliza la formación de dextranos, polímeros extracelulares que permiten la adherencia de este microorganismo a las superficies del diente. La bacitracina selecciona la especie *Streptococcus mutans* entre otros *Streptococcus* bucales.

Las colonias de *Streptococcus mutans* en el medio selectivo se pueden observar a ojo desnudo o bajo lupa. Se presentan de diversas formas: lisas, rugosas, grandes o pequeñas, pero lo más característico es su aspecto de vidrio esmerilado y al tocarlas con el asa de platino no se disgregan o se encuentran adheridas al agar.

Para aislar, identificar y cuantificar *Streptococcus mutans* se usan muestras de placa supragingival y de saliva estimulada, pero la más utilizada que entrega mejores resultados es la de saliva estimulada.

II. Objetivos

1. Conocer la toma de muestra, siembra y cultivo de *S.mutans*.
2. Conocer las características coloniales del *S mutans*.
3. Conocer y analizar los principales mecanismos de virulencia de este microorganismo patógeno.
4. Observar el avance y el daño de los microorganismos cariogénicos sobre los tejidos del diente.

III. Actividades

1.-Siguiendo las instrucciones del docente recolecte saliva estimulada en un tubo estéril, diluya la muestra 1/10 en buffer fosfato estéril, siembre 100 microlitros de la dilución en agar TYCSB, rotule e incube las placas a 37° C en jarra de anaerobiosis.

2.- Bajo la supervisión del docente, a partir de cultivos bacterianos en medio de cultivo TYCSB, observe el aspecto de las colonias bacterianas compatibles con *S mutans*.

3.-Con el asa de platino arrastre y disgregue una colonia de *S. mutans*, compare la adherencia con otras colonias crecidas en el agar TYCSB.

5.-Con ayuda del asa de platino cuente las colonias compatibles con *S.mutans* y determine el riesgo de caries del paciente en estudio.

6.-Observe al microscopio cortes de diente con caries, con ayuda del docente efectúe un análisis de lo observado.

Trabajo Práctico N°3

Enfermedad Periodontal

I. Introducción

Enfermedad Periodontal

Es una familia de enfermedades que se caracterizan por la destrucción de los tejidos de soporte del diente como resultado de la respuesta inmunoinflamatoria del hospedero a la agresión microbiana. Se considera como una enfermedad inflamatoria crónica multifactorial que se inicia por la acción patogénica de un complejo de especies bacterianas organizadas en un biofilm (placa subgingival), las que interactúan con los tejidos del hospedero desencadenando su respuesta inmunoinflamatoria.

Muchos patógenos fueron descubiertos durante el siglo XIX y el conocimiento que se tiene actualmente de ellos ha permitido salvar a muchos pacientes. Ciertos criterios conocidos como los postulados de Koch se establecieron para asociar patógenos de importancia médica con una determinada enfermedad. Del mismo modo, en el caso de la enfermedad periodontal, se han propuesto los postulados de Koch modificados por Socransky (1979) para asociar periodontopatógenos con el inicio y/o progreso de la enfermedad periodontal. Así podemos enunciar que:

- a. El periodontopatógeno en estudio debe asociarse con la enfermedad y su eliminación del foco infeccioso debería dar como resultado la detención de la progresión de la enfermedad (criterio de asociación).
- b. El periodontopatógeno debe inducir una respuesta inmune detectable en el hospedero.
- c. El periodontopatógeno debe producir la enfermedad al ser inoculado en animales de experimentación.
- d. El periodontopatógeno debe presentar una capacidad patogénica demostrable.

Basados en los criterios propuestos, varios periodontopatógenos se han asociado con la etiología de esta enfermedad. Actualmente se han reportado más de 600 especies bacterianas, capaces de colonizar el área subgingival. La estrategia inicial para la identificación de bacterias periodontopatógenas, fue comparar la composición microbiana de muestras del biofilm subgingival, de individuos sanos, con gingivitis y con periodontitis, pudiéndose identificar algunos periodontopatógenos, tanto en el inicio como en la progresión de la enfermedad, esta microbiota presenta características muy particulares que les permiten colonizar el área subgingival. Se trata de una microbiota formada principalmente por bacilos Gram negativo, inmóviles (a excepción de *T.denticola*), proteolíticos y anaerobios obligados o aerotolerantes.

En 1998, Socransky y colaboradores establecieron la asociación de determinados complejos bacterianos con la etiología de la enfermedad periodontal. Así el complejo rojo, formado por: *P.gingivalis*, *T.forsythia* y *T.denticola*, es el más significativo en la progresión de la Enfermedad periodontal, ya que sus miembros aumentan en número y prevalencia en asociación directa con el aumento de los parámetros clínicos de la

enfermedad. *P.gingivalis* y *T.denticola* presentan una serie de factores de virulencia que los hacen los primeros candidatos involucrados en la destrucción del tejido periodontal. Luego, el complejo naranja formado por *P.intermedia*, *P.nigrescens*, *P.micros*, *F.nucleatum*, *Campylobacter spp*, *E.nodatum* y *S. constellatus*, presenta una asociación menos fuerte, posiblemente determinada por mecanismos de patogenicidad menos agresivos. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotipo b, no se encontró formando parte de ningún complejo, aún cuando es un patógeno asociado fuertemente a las formas agresivas de la enfermedad.

La mayoría de las bacterias periodontopatógenicas se pueden aislar mediante cultivo, a partir de muestras de sacos periodontales. Se requieren medios enriquecidos con sangre, hemina y menadiona. En general se trata de microorganismos proteolíticos, por lo que es esencial el aporte de nutrientes necesarios para su desarrollo. Miembros del complejo rojo y naranja, anaerobios obligados, deben ser cultivados en jarras con generador de anaerobiosis, a una temperatura entre 35 a 36°C por un periodo que va desde 7 a 14 días. Para el cultivo y aislamiento de *A. actinomycetemcomitans* se emplea un medio selectivo al que se le adiciona suero de caballo y antibióticos (Bacitracina y Vancomicina). Las diferentes especies bacterianas presentan características macromorfológicas (coloniales), que permiten orientar el diagnóstico microbiológico y es posible realizar pruebas rápidas que permitan identificar las especies de mayor relevancia en patología periodontal.

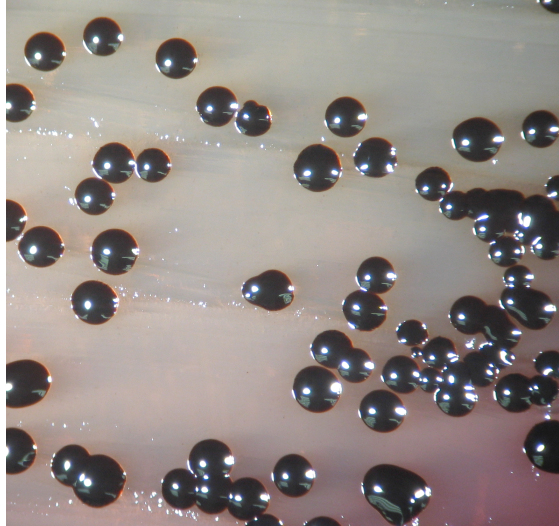
II. Objetivos

1. Conocer características macromorfológicas y fisiológicas de colonias de patógenos periodontales.
2. Estimar la relación porcentual de patógenos periodontales en la microbiota total de un sitio enfermo respecto de un sitio sano.

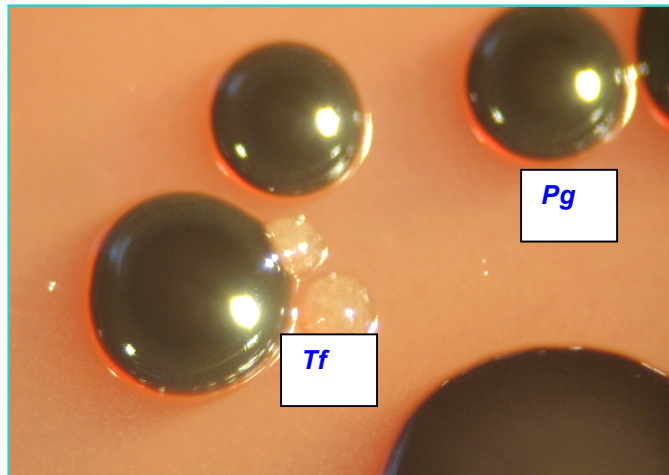
III. Actividades

1. Observar a ojo desnudo y bajo lupa, placas de Petri con desarrollo colonial de patógenos periodontales. Con supervisión del docente identifique colonias características de patógenos periodontales determinados.
2. Observe y estime a ojo desnudo la cantidad relativa de colonias de patógenos periodontales provenientes de sitios sanos y de saco periodontal.
3. Observe al microscopio frotis con tinción de Gram de placa subgingival provenientes de pacientes con enfermedad periodontal y de pacientes sanos.

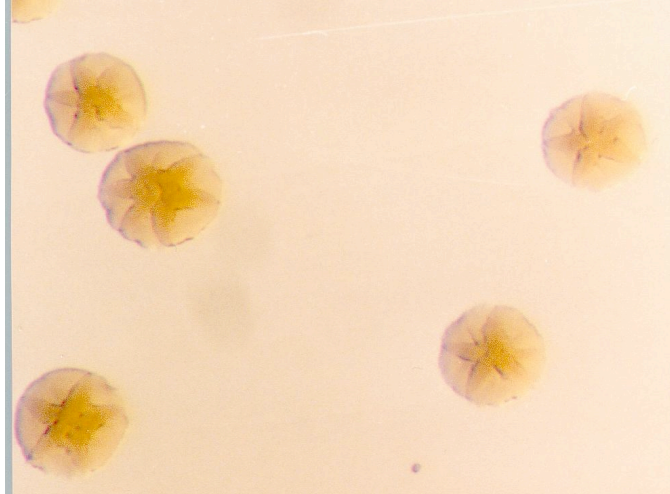
ASPECTO MACROMORFOLÓGICO DE COLONIAS DE ALGUNOS PATOGENOS
PERIODONTALES
(Fotografías obtenidas con lupa estereoscópica Zeiss Stemi 2000C. Laboratorio de
Microbiología Bucal. Fac. de Odontología, U. de Chile).



Colonias de *Porphyromona gingivalis* en agar sangre hemina -
menadiona



Colonias de *P.gingivalis* y *T.forsythia* en agar sangre hemina-
menadiona



Colonias de *A.actinomycetemcomitans* en medio selectivo TSBV

Trabajo Práctico N°4

Bioseguridad

I. Introducción

El perfil de los pacientes que se atienden en los hospitales, centros médicos y centros de atención de salud, ha cambiado enormemente los últimos años, producto de la aparición de nuevas enfermedades e incorporación de nueva tecnología de diagnóstico o tratamiento. Entre los cambios más relevantes debe mencionarse la epidemia de VIH/SIDA y el creciente número de pacientes en tratamiento con drogas inmunosupresoras, entre otros. Las nuevas enfermedades producen nuevos problemas y desafíos.

La gran mayoría de los pacientes que ingresan a los hospitales y serán sometidos a algún tipo de procedimiento invasivo de distinta índole, desde una punción intravenosa simple a una intervención quirúrgica mayor con implantes permanentes. La esterilización o desinfección de los artículos de uso clínico constituyen mecanismos eficientes, actualmente indiscutibles, para prevenir infecciones asociadas a la atención en salud.

La Microbiología médica se preocupa tanto del estudio de la etiopatogenia y de la quimioterapia de las enfermedades infecciosas como de investigar la forma de prevenirlas.

Un aspecto importante del control de las infecciones reside en la comprensión de los principios básicos de la esterilización, la desinfección y la antisepsia.

1. Esterilización

La esterilización es el resultado de un proceso y no sólo la exposición al agente esterilizante. Para conseguir material estéril se deben realizar una serie de procedimientos independientes como son: lavado/descontaminación, inspección, preparación/empaque, exposición al método de esterilización, almacenamiento y entrega.

Cada uno de estos procedimientos tiene importancia en el resultado y si existen fallas en cualquiera de ellos, el material no puede considerarse estéril aún cuando haya sido sometido a un método de esterilización.

Los procedimientos destinados a lograr material estéril en los hospitales o centros de salud pueden realizarse en forma centralizada o descentralizada. La centralización de la esterilización involucra que todos los procedimientos sean realizados en un mismo lugar físico y bajo una supervisión uniforme. En la actualidad esta es la forma que se considera más eficiente, segura y efectiva para el manejo del material debido a que es la única manera de garantizar uniformidad en todas las etapas del proceso.

2. Etapas del proceso de esterilización:

A. Limpieza/descontaminación:

Es la remoción mecánica de toda materia extraña en las superficies de objetos inanimados. En general se consigue con la utilización de agua y detergente. La materia orgánica e inorgánica presente en los artículos interfiere con los métodos de esterilización y desinfección ya sea impidiendo el contacto del agente esterilizante con

todas las superficies o, en el caso de procesamiento por calor, prolongando los tiempos de exposición requeridos para lograr el mismo objetivo.

La limpieza disminuye la carga microbiana por arrastre pero no destruye microorganismos. Puede realizarse a través de métodos manuales o automáticos. Siempre debe realizarse una prolija limpieza antes de procesar los artículos.

Se entiende por descontaminación a la remoción de los microorganismos de los objetos o artículos contaminados durante la atención del paciente, por contacto con fluidos corporales o restos orgánicos, con el objeto de dejarlos seguros para su manipulación y prevenir exposiciones accidentales del personal que entra en contacto con ellos. "Todo material que ha estado en contacto con sangre o fluidos corporales debe tratarse como contaminado".

Para esos efectos el personal que manipula instrumental sucio, debe utilizar barreras protectoras que son guantes gruesos impermeables de goma, pechera plástica, escudos faciales o lentes protectores. (Norma General de Prevención y Control de las Infecciones Intrahospitalarias Ministerio de Salud 1993). El término también se aplica a material contaminado por uso en el laboratorio de Microbiología.

B. Inspección:

Corresponde a la evaluación visual de los artículos lavados en búsqueda de desperfectos o suciedad que pudieran interferir en los métodos de esterilización. Esta debe ser realizada en forma minuciosa con apoyo de una lupa en cada uno de los artículos antes de proceder a su preparación y empaque.

C. Preparación/empaque:

En esta etapa los artículos son preparados y empaquetados en condiciones que se facilite su uso y se eviten daños y deterioro del material. Cada artículo tiene requerimientos especiales en cuanto a preparación que deben ser considerados. El empaque requerido por cada artículo depende del método de esterilización, su naturaleza y el uso a que está destinado. Deben ser permeables al método de esterilización que se utilice y resistente al almacenamiento hasta el momento de uso a fin de otorgar seguridad al usuario.

D. Esterilización:

Es la eliminación completa de toda forma de vida microbiana de objetos inanimados incluyendo esporas bacterianas. Puede conseguirse a través de métodos físicos, químicos o gaseosos.

E. Almacenamiento:

Corresponde al proceso a través del cual, los artículos son conservados hasta su uso. Las condiciones de almacenamiento deben asegurar la esterilidad o desinfección del artículo al momento del uso.

F. Entrega de materiales:

Corresponde a la distribución de los materiales a los servicios usuarios en cantidad y calidad necesaria para sus requerimientos.

G. Certificación de los métodos de esterilización:

Constituyen indicadores que permiten verificar que los materiales fueron sometidos a procesos de esterilización y como resultado se encuentran estériles.

3. Métodos De Esterilización

Existen métodos de esterilización por alta temperatura y por baja temperatura. Los métodos de esterilización por altas temperaturas son el autoclave a vapor y el horno por calor seco. El autoclave a vapor se considera el método de esterilización más efectivo en la actualidad debido a que es rápido, certificable y costo beneficio favorable. Debe ser seleccionado como primera opción y sólo procesar por otros métodos materiales no susceptibles de ser sometidos a este sistema. Los hornos o pupinel eliminan microorganismos por calor seco. Los métodos de esterilización a baja temperatura son el óxido de etileno (ETO), el vapor de formaldehído, el plasma de peróxido de hidrógeno, el plasma combinado y el ácido peracético líquido. En estos métodos, los parámetros críticos de esterilización son la temperatura, presión, tiempo y concentración del agente los que tienen distintos grados de toxicidad para los

pacientes y el personal. Los tiempos de ciclos son distintos dependiendo de la tecnología empleada. La compatibilidad de los materiales es diferente en las distintas tecnologías por lo que debe conocerse previo a someter el material a ellas. El ácido peracético sólo es compatible con material sumergible. Opera en un equipo automático en tiempos de 30 minutos. La esterilización por radiaciones ionizantes requiere infraestructura especializada y no puede ser realizada en las instituciones de salud.

3. 1. Métodos de Esterilización a altas temperaturas:

3.1.2 Esterilización por calor húmedo:

Este método de esterilización elimina microorganismos por desnaturalización y coagulación de las proteínas con vapor saturado y temperaturas entre 121° y 134°C , requiriendo temperaturas y tiempos de esterilización cortos.

Para la esterilización por calor húmedo se utilizan equipos denominados autoclaves a vapor. Hoy en día la mayoría de los materiales y artículos que requieren ser estériles en un establecimiento como el instrumental quirúrgico, los textiles y gomas pueden ser procesados en autoclave.

3.1.3 Esterilización por calor seco en pupinel:

Este sistema elimina microorganismos por desecación y carbonización de las proteínas, el pupinel opera a temperaturas que van desde 120° a 180° C y por tiempos mayores a 30 minutos. Su efectividad depende de la difusión del calor, la cantidad de calor disponible y los niveles de pérdida de calor. La acción microbicida del calor seco está condicionada por la presencia de materia orgánica o suciedad en el artículo.

Este método es difícil de certificar excepto en equipos complejos y especializados. El calor seco penetra lentamente en los materiales por lo que se requieren largos períodos de exposición. Debido a las altas temperaturas necesarias para destruir los microorganismos, es inapropiado para algunos materiales como líquidos, gomas y géneros. Por otra parte daña el instrumental porque reduce el temple del acero. El uso del calor seco debe limitarse a materiales que no pueden ser esterilizados en autoclave.

Los materiales que pueden esterilizarse en pupinel y no pueden esterilizarse en autoclave son sólo aceites, vaselina, petrolatos y polvos.

3.2 Esterilización por radiaciones ionizantes:

Las radiaciones ionizantes se consideraron un método práctico de esterilización en la década de los 50 cuando se descubrieron sus propiedades para la eliminación de microorganismos. Coincidió también la utilización de este método con el desarrollo de material desechable en gran escala.

La esterilización se obtiene sometiendo los materiales a dosis predeterminadas de radiaciones. Hasta la fecha se han utilizado tecnologías con rayos gamma. Este tipo de proceso es de alta complejidad y sólo puede ser realizado bajo estrictas condiciones de seguridad. Requiere infraestructura especializada que en general no es posible ni se justifica en centros de salud. El material debe cumplir requisitos estrictos en cuanto a manufactura y empaque. Este método se encuentra limitado a plantas industriales para artículos nuevos y de un sólo uso. En general la mayoría de los materiales pueden ser irradiados incluyendo, látex, celulosa, líquidos y género.

4. Certificación de los procesos de esterilización

Los indicadores de esterilización tienen como objetivo certificar que el proceso se efectuó en forma adecuada. Existen indicadores de proceso del equipo, indicadores químicos e indicadores biológicos. Los indicadores del equipo son elementos incorporados que permiten visualizar si los parámetros requeridos se cumplieron. Los indicadores químicos son dispositivos que cambian de color cuando se exponen a una o más variables críticas del proceso y dependiendo de cuantas variables certifiquen pueden ser uniparámetros, multiparámetros o integrados cuando certifican todas las variables críticas del proceso. Debe usarse un indicador químico en cada paquete a esterilizar debido a que permiten diferenciar materiales que han sido sometidos o no a procesos de esterilización. Los indicadores biológicos se utilizan para certificar la muerte de microorganismos una vez terminado el proceso. Los indicadores biológicos convencionales se fabrican sobre la base de esporas de microorganismos que son sometidas al proceso y luego se comprueba su muerte. Los indicadores biológicos se utilizan para evaluar la efectividad de los equipos y deben usarse semanalmente en todos los equipos de esterilización y cada vez que se reparan.

5. Desinfección y uso de desinfectantes

La desinfección es un proceso que elimina microorganismos vegetativos de objetos inanimados y no asegura la eliminación de esporas. Este proceso consiste en poner en contacto el material o superficies con agentes

químicos. Los desinfectantes de uso más frecuente son: alcoholes, amonios cuaternarios, cloro y compuestos clorados, fenoles, formaldehído, glutaraldehído, y peróxido de hidrógeno estabilizado.

De acuerdo al tipo de agentes que es capaz de destruir, se han definido tres niveles de desinfección: alto, intermedio y bajo.

La desinfección de alto nivel elimina todos los microorganismos incluyendo esporas, los virus resistentes y *Mycobacterium tuberculosis*.

La desinfección de nivel intermedio elimina formas vegetativas de bacterias, hongos y virus pero no necesariamente todos los virus de tamaño pequeño no lipídico. La desinfección de nivel bajo elimina bacterias patógenas en su forma vegetativa y algunos hongos, no elimina el *Mycobacterium tuberculosis* ni los virus de tamaño pequeño no lipídico. Existen desinfectantes de nivel bajo que no destruyen las formas vegetativas de todas las bacterias.

5.1 Alcoholes

Son componentes químicos solubles en agua, los más utilizados son el alcohol etílico y el alcohol isopropílico. Destruyen rápidamente formas vegetativas de bacterias, hongos, virus y *M. tuberculosis*. Actúa por desnaturalización de las proteínas y su actividad cae bruscamente en concentraciones menores al 50%.

La concentración bactericida óptima está en un rango de 60% a 90% por volumen. La concentración habitual de uso es 70% en que tiene su mayor efectividad. El alcohol se considera un desinfectante de nivel intermedio y se usa en la desinfección de superficies y artículos no críticos. Se utiliza en la desinfección de termómetros orales y rectales, laringoscopios y pequeñas superficies como las tapas de goma de algunos frascos de medicamentos y para el enjuague de canales de endoscopios. Las desventajas de los alcoholes en los equipos son que dañan la cubierta de los lentes, tienden a alterar y endurecer el material de goma y plástico, se inactivan en presencia de materia orgánica y se evaporan rápidamente. Esto condiciona que no se deben usar alcoholes como método de desinfección de alto nivel ni para materiales en inmersión.

5.1.2 Cloro y compuestos derivados del cloro

Los agentes clorados tienen amplio espectro microbicida. Su uso está limitado porque se inactivan en presencia de materia orgánica, son inestables y corroen el material metálico. Por otra parte, son tóxicos en contacto con piel y mucosas.

Los hipocloritos son los desinfectantes clorados más utilizados. Su presentación líquida como hipoclorito de sodio es la más conocida, y existe una forma sólida como hipoclorito de calcio. El mecanismo de acción por el cual el cloro libre destruye los microorganismos no ha sido bien dilucidado. Se postula la inhibición de algunas reacciones enzimáticas, la desnaturalización de las proteínas y la inactivación de los ácidos nucleicos.

Las soluciones de cloro no deben conservarse en envases destapados por más de 12 horas debido a la evaporación del producto activo, haciendo que las concentraciones de cloro disponible disminuyan. Las formulaciones líquidas a temperatura ambiente pueden conservar sus propiedades cuando se almacenan en contenedores cerrados, en oscuridad y a capacidad completa por un período de un mes. Sin embargo, si se abre y cierra el contenedor durante este período, la concentración original puede disminuir entre 40 y 50%. Su uso en la actualidad se limita al saneamiento ambiental común de las superficies y artículos no críticos.

6. Antisépticos y antisepsia

Los antisépticos son sustancias químicas destinadas a eliminar microorganismos presentes en las superficies de los tejidos vivos (piel y mucosas), los más utilizados son el alcohol, el yodo combinado con alcohol o con povidona y la clorhexidina. Antisepsia es por lo tanto la utilización de agentes químicos sobre piel o sobre otros tejidos vivos para inhibir o eliminar los microorganismos; no implica una acción esporocida.

Esterilización en Autoclave

Temperatura (Grados Celsius)	Tiempo (Minutos)	Presión (Atmósferas)
121°	15	1.5
126°	10	2
134°	3	2.9

Esterilización en horno Pasteur

Temperatura	Tiempo de Exposición
180°C	30 Minutos
170°C	1 Hora
160°C	2 Horas
150°C	3 Horas
140°C	4 Horas
120°C	6 Horas

OBJETIVOS:

1. Conocer los métodos de control del proceso de esterilización en Autoclave.
2. Conocer y evaluar la acción de los desinfectantes de uso rutinario en la clínica odontológica.

Actividades:

- 1.-Los alumnos disponen de material esterilizado en Autoclave, junto con un control biológico a tiempos adecuados e inadecuados .A estos controles biológicos provenientes de las distintas cargas de esterilización se les agregará caldo de cultivo estéril. Rotular y llevar a estufa a 37°C.
- 2.-Los alumnos disponen de extractores pulpares contaminados con un cultivo líquido de bacterias esporuladas, además disponen de alcohol 70%, hipoclorito de Sodio 0.5% y detergente enzimático.
 - a) Tome los extractores pulpares (2) y sumérgalos cada uno en los desinfectantes por dos tiempos diferentes: 5 y 30 minutos
 - b) Retírelos con pinzas y dépositelos en tubos con caldo de cultivo estéril, rotule y lleve a estufa a 37°C.
- 3.-Los alumnos disponen de una cepa bacteriana esporulada, además tendrán hisopos estériles y 2 desinfectantes :hipoclorito y alcohol.

- a) Contamine un área de una placa de petri vacía con una tórula embebida en la cepa bacteriana y deje actuar por 5 minutos.
 - b) Con un hisopo estéril tome una muestra y siembre en la mitad de una placa de Agar sangre.
 - c) Deje actuar cloro durante 5 minutos sobre la superficie que usted contaminó.
 - d) Con un hisopo estéril tome una muestra de esa superficie y siembre en la otra mitad de la placa de Agar sangre.
 - e) Repita los mismos pasos con el alcohol .Rotule y lleve todo el material a la estufa a37°C.
3. Los alumnos disponen de 2 placas de Agar sangre, hisopos estériles y un antiséptico (clorhexidina al 4%)
- a) Con un hisopo estéril tome una muestra de la palma de la mano y siembre en Agar sangre
 - b) Con un hisopo embebido en clorhexidina limpie la misma zona de la palma de la mano del punto anterior y con otro hisopo estéril, tome una muestra y siembre en Agar sangre